

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-038324

(43)Date of publication of application : 12.02.1999

(51)Int.Cl.

G02B 21/00

(21)Application number : 09-212597

(71)Applicant : NIKON CORP

(22)Date of filing : 23.07.1997

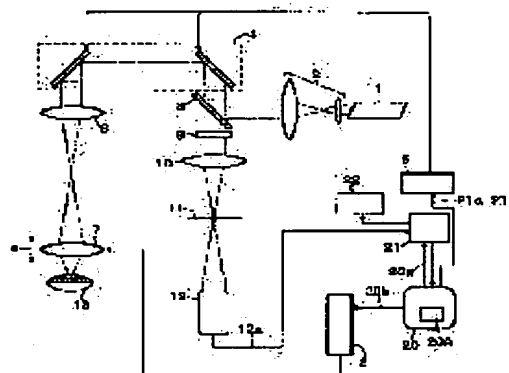
(72)Inventor : YAMAGAKI KOUJI

(54) LASER SCANNING MICROSCOPE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a laser scanning microscope that can continuously obtain neither too much not too little section images even though the thickness of a sample is not previously calculated.

SOLUTION: This microscope is provided with a dichroic mirror 3 reflecting an exciting laser beam and also transmitting fluorescence, a two-dimensional scanning unit 4 two-dimensionally scanning the sample 13 with the exciting laser beam, an objective lens 7 arranged between the two-dimensional scanning unit 4 and the sample 13, a Z-axis controller whose relative position with the sample 13 and the objective lens 7 in an optical axis direction is made movable and a monitor 22 observing the fluorescence. In this case, the relative position is moved in the optical axis direction by a specified distance by driving the Z-axis controller 8, and the image information of the section images acquired by each movement is compared with each other, and the acquisition of the section images is completed based on the compared result of the image information.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-38324

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月12日

(51) Int.Cl.⁶

G 0 2 B 21/00

識別記号

F I

G 0 2 B 21/00

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平9-212597

(22) 出願日 平成9年(1997) 7月23日

(71) 出願人 000004112

株式会社ニコン

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号

(72) 発明者 山垣 浩司

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株

式会社ニコン内

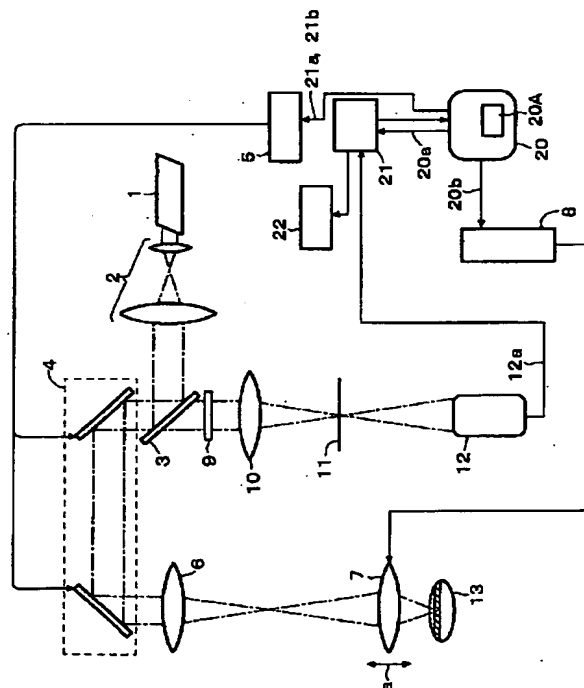
(74) 代理人 弁理士 木内 修

(54) 【発明の名称】 レーザ走査顕微鏡

(57) 【要約】

【課題】 試料の厚さを予め計算しなくとも過不足のない切片像を連続的に取得できるレーザ走査顕微鏡を提供する。

【解決手段】 励起レーザ光を反射させるとともに蛍光を透過させるダイクロイックミラー3と、励起レーザ光を試料13上で2次元走査する2次元スキャンユニット4と、2次元スキャンユニット4と試料13との間に配置された対物レンズ7と、試料13と対物レンズ7との光軸方向における相対位置を移動可能なZ軸コントローラ8と、蛍光を観察するモニタ22とを備えたレーザ走査顕微鏡において、Z軸コントローラ8を駆動させて相対位置を光軸方向へ所定距離ずつ移動させ、その移動の度に取得される切片像同士の画像情報を比較し、この画像情報の比較結果に基づいて切片像の取得を終了させる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 励起レーザ光を反射するとともに蛍光を透過する光分離手段と、

前記励起レーザ光を試料上で2次元走査する走査手段と、

前記走査手段と前記試料との間に配置された対物レンズと、

前記試料と前記対物レンズとの光軸方向における相対位置を移動可能な駆動手段と、

前記光分離手段を透過した蛍光を受光して、試料の切片像を取得する観察手段とを備えたレーザ走査顕微鏡において、

前記駆動手段を駆動して前記相対位置を光軸方向へ所定距離ずつ移動させ、その移動の度に、移動前後に取得される切片像同士の画像情報を比較し、この画像情報の比較結果に基づいて前記切片像の取得を終了させる制御手段を備えていることを特徴とするレーザ走査顕微鏡。

【請求項2】 前記画像情報は各画素の輝度情報であり、前記比較する前の前記輝度情報が予め定められた閾値以上の値を所定の割合以上有するとき、前記制御手段は切片像の取得を続けることを特徴とする請求項1記載のレーザ走査顕微鏡。

【請求項3】 前記画像情報は各画素の輝度情報であり、前記比較結果が予め定められた閾値以下の値を所定割合以上有するとき、制御手段は切片像の取得を終了することを特徴とする請求項1記載のレーザ走査顕微鏡。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明はレーザ走査顕微鏡に関する。

【0002】

【従来の技術】 共焦点レーザ走査顕微鏡は、励起レーザ光を試料に照射するレーザ光源と、励起レーザ光と試料から発せられる蛍光とを分離するダイクロイックミラーと、励起レーザ光を2次元走査する2次元スキャンユニットと、2次元スキャンユニットと試料との間に配置された対物レンズと、ダイクロイックミラーと検出装置との間に配置され、集光レンズと集光レンズの焦点面に設けられたピンホールと、試料と対物レンズとの光軸方向における相対位置を移動可能な駆動装置と、蛍光を観察する観察装置とを備える。

【0003】 レーザ光源から射出された励起レーザ光は、ダイクロイックミラーによって反射された後、2次元スキャンユニットによって2次元走査され、対物レンズによって光軸にほぼ直角な試料面に集光される。

【0004】 励起レーザ光の照射によって試料から発生した蛍光は励起レーザ光とともに対物レンズから走査ミラーへと光路を逆行し、ダイクロイックミラーで励起レーザ光と分離される。

【0005】 ダイクロイックミラーを透過した蛍光は、

集光レンズにより光路中に配置したピンホールに集光される。このとき、試料の結像部で発した蛍光のみがピンホールを通過し、検出装置で受光されるとともに、検出装置で光量に応じた電気信号に変換される。

【0006】 この電気信号と走査位置情報とをコンピュータを用いて所定の処理を行うことで試料の非常に薄い切片像が得られる。このとき、駆動装置を駆動して焦点面を光軸方向へ移動させて対物レンズと試料との距離（ピント）を変えることにより、各焦点面における切片像を連続的に取得することができる。

【0007】 試料全体の切片像を取得するには、予め試料の厚さを求め、この厚さに応じて焦点面の移動間隔や取得する切片像の枚数等の条件を、予めメモリに記憶させておく必要がある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、試料の厚さを求めるには、1枚目（試料の最上部）の画像取得時のステージのZ方向（光軸方向）の位置と最後（試料の最下部）の画像取得時のステージのZ方向の位置とから試料の厚さを予め計算しておく必要があり、煩わしいものであった。

【0009】 試料の厚さが正確に求められていないと、連続的に取得される切片像の枚数に過不足が生じてしまう。

【0010】 図4及び図5は試料の厚さと切片像の枚数との関係を説明する図である。

【0011】 例えば、計算で求めた試料の厚さが実際の試料113よりも薄い場合には、試料113の厚さ方向において必要とする枚数の切片像113Aを取得することができず、試料113の画像情報113Bが不足してしまう（図4参照）。

【0012】 逆に計算で求めた試料の厚さが実際の試料113の厚さより厚い場合には、試料113の画像情報113Bとして意味のない切片像113Aまで取得してしまう（図5参照）。

【0013】 また、試料113の厚さを求めるためには試料113の同じ部分をレーザ光によって繰り返し走査するので、レーザ光の照射によって蛍光を発する試料の場合には、試料のダメージや蛍光の退色が大きくなってしまいう問題がある。

【0014】 この発明はこのような事情に鑑みてなされたもので、その課題は試料の厚さを予め計算しなくとも過不足なく、試料全体の切片像を連続的に取得できるレーザ走査顕微鏡を提供することである。

【0015】

【課題を解決するための手段】 前述の課題を解決するため請求項1記載の発明のレーザ走査顕微鏡は、励起レーザ光を反射するとともに蛍光を透過する光分離手段と、前記励起レーザ光を試料上で2次元走査する走査手段と、前記走査手段と前記試料との間に配置された対物レ

レンズと、前記試料と前記対物レンズとの光軸方向における相対位置を移動可能な駆動手段と、前記光分離手段を透過した蛍光を受光して、試料の切片像を取得する観察手段とを備えたレーザ走査顕微鏡において、前記駆動手段を駆動して前記相対位置を光軸方向へ所定距離ずつ移動させ、その移動の度に、移動前後に取得される切片像同士の画像情報を比較し、この画像情報の比較結果に基づいて前記切片像の取得を終了させる制御手段を備えていることを特徴とする。

【0016】駆動手段を駆動させて相対位置を光軸方向へ所定距離ずつ移動させ、その移動の度に取得される切片像同士の画像情報を比較し、この画像情報の比較結果に基づいて切片像の取得を終了させるので、試料が存在し、前に取得した切片像と後で取得した切片像の画像情報が異なっている間は、焦点面の移動と切片像の取得とが行われ、試料が存在しなくなり隣り合う切片像の画像情報が同じになったとき、光軸方向の移動と切片像の取得とが終了する。

【0017】請求項2記載の発明のレーザ走査顕微鏡は、請求項1記載のレーザ走査顕微鏡において、前記画像情報は各画素の輝度情報であり、前記比較する前の前記輝度情報が予め定められた閾値以上の値を所定の割合以上有するとき、前記制御手段は切片像の取得を続けることを特徴とする。

【0018】比較する前の輝度情報が予め定められた閾値以上の値を所定の割合以上有するときには、試料が存在すると判断され、切片像取得が続けられる。

【0019】請求項3記載の発明のレーザ走査顕微鏡は、請求項1記載のレーザ走査顕微鏡において、前記画像情報は各画素の輝度情報であり、前記比較結果が予め定められた閾値以下の値を所定割合以上有するとき、制御手段は切片像の取得を終了する。

【0020】比較結果が予め定められた閾値以下の値を所定割合以上有するとき、試料が存在しないと判断され、切片像の取得が終了する。

【0021】

【発明の実施の形態】以下、この発明の実施の形態を図面に基いて説明する。

【0022】図1はこの発明の第1実施形態に係る共焦点レーザ走査顕微鏡のブロック構成図である。

【0023】共焦点レーザ走査顕微鏡は、レーザ光源1と、ビームエキスパンダ2と、ダイクロイックミラー（光分離手段）3と、2次元スキャンユニット（走査手段）4と、スキャナコントローラ5と、集光レンズ6と、対物レンズ7と、Z軸コントローラ（駆動手段）8と、吸収フィルタ9と、集光レンズ10と、ピンホールフィルタ11と、光検出器12と、コンピュータ（制御手段）20と、画像処理回路21と、モニタ（観察手段）22とを備える。

【0024】光源1は励起レーザ光（以後、レーザ光と

いう）を発してステージ（図示せず）上に載置された試料13に照射する。

【0025】ビームエキスパンダ2はレーザ光を対物レンズの瞳面を満たす大きさに拡大する。

【0026】ダイクロイックミラー2はレーザ光を透過させないが試料13から発せられる蛍光を透過させる。

【0027】2次元スキャンユニット4はスキャナコントローラ5によってXY方向の走査を行う水平スキャナ4Aと垂直スキャナ4Bとを備える。

【0028】スキャナコントローラ5はコンピュータ20から出力される水平同期信号21aと垂直同期信号21bとに基づいて水平スキャナ4Aと垂直スキャナ4Bとを制御する。

【0029】対物レンズ7は2次元スキャンユニット4と試料13との間に配置され、Z軸コントローラ8によって試料13に対して光軸方向に移動される。

【0030】Z軸コントローラ8はコンピュータ20から出力される、光軸方向の移動間隔及び移動方向aを指示する移動信号20bによって制御される。

【0031】Z軸コントローラ8としては、例えばDCサーボモータを用いることができる。

【0032】集光レンズ10はダイクロイックミラー3によって分離され、吸収フィルタ9を通過した光を集光させる。

【0033】ピンホールフィルタ11は対物レンズ7の焦点面と共役な位置に設けられ、試料13の結像部で発した光だけを通過させる。

【0034】蛍光検出器12はピンホールフィルタ11を通過した試料13の光を検出し、入力した光を光強度を表す信号12aに変換する。

【0035】画像処理回路21はA/D変換器、フレームメモリ、D/A変換器等の画像化のための回路を備える。

【0036】この画像処理回路21は光検出器12の信号12aとコンピュータ20から出力される、ピクセルクロック信号20aとに基づいて試料の切片像をフレームメモリに記録するとともに、取得した切片像をモニタ22に表示する。また、取得した切片像の画像情報をコンピュータ20に送信する。

【0037】図2はコンピュータ20による切片画像の取得方法を説明するフローチャートである。なお、図2においてS1～S8は各ステップを示す。

【0038】まず、ユーザは光軸方向の移動間隔等の情報をキーボード（図示せず）から入力する。この情報はメモリ20Aに記憶される。

【0039】操作者は、Z軸コントローラ8を駆動し、モニタ22で画像を見ながら試料13の上端部の画像に焦点を合わせ、1枚目の切片像としてZ方向（光軸方向）の位置を設定する。この焦点位置で2次元スキャンユニット4による2次元走査を行い、切片像の画像情報

をメモリ20Aに記憶する。(S1)。

【0040】次に、コンピュータ20はZ軸コントローラ8を駆動し、対物レンズ7を光軸方向へ所定間隔だけ下降させる(S2)。

【0041】この新たな焦点位置で、2次元スキャンユニット4による試料13の2次元走査を行い、切片像の画像情報を取得する(S3)。

【0042】コンピュータ20は、画像処理回路21から取得した画像情報から、各画素のピクセル値を求め、ピクセル値(輝度値を0~255の段階に数値化したもの)が20以上になるピクセル数の占める割合が全ピクセル数の10%以下であるか否かを判定する(S4)。

【0043】S4でピクセル値が20以上になるピクセル数の占める割合が全ピクセル数の10%以下でないと判断された場合には、今回取得した切片像の画像情報をメモリ20Aに記憶する(S5)。

【0044】S4でピクセル値が20以上になるピクセル数の占める割合が全ピクセル数の10%以下であると判断された場合には、今回取得した切片像の画像情報から前回取得した切片像の画像情報を減算(対応するピクセルのピクセル値の減算)する(S6)。

【0045】次に、コンピュータ20は、S6で減算したピクセル値の絶対値が10以下になるピクセル数を求め、そのピクセル数の占める割合が全ピクセル数の90%以上であるか否かを判定する(S7)。

【0046】ピクセル値の絶対値が10以下になるピクセル数の占める割合が全ピクセル数の90%以上でない場合には、取得した切片像の画像情報をメモリ20Aに記憶する(S8)。

【0047】ピクセル値の絶対値が10以下になるピクセル数の占める割合が全ピクセル数の90%以上である場合には、試料13がないと判断して切片像の画像情報の取得を終了する(S9)。

【0048】この第1実施形態によれば、以下の効果を発揮できる。

【0049】試料13が存在し切片像間の画像情報が異なっている間は、焦点面の移動と切片像の取得とを行い、焦点面に試料13が存在しなくなり切片像間の画像情報が同じになったとき、Z方向の移動と切片像の取得を終了させるので、試料13の厚さを予め計算しなくとも過不足なく切片像の画像情報を取得することができる。

【0050】試料13の厚さを予め計算するために試料13の同じ部分を繰り返し走査する必要がなく、1回の走査だけでよいので、蛍光を発する試料13の場合でもダメージや蛍光の退色を抑えることができる。

【0051】ピクセル値が20以上になるピクセル数の占める割合が全ピクセル数の10%以下でない場合、切片像の画像情報を取得するようにしたので、切片像間のピクセル値の差が小さい場合でも切片像の取得を終了

し、画像情報が不足してしまうという不都合が生じない。

【0052】ピクセル値が10以下になるピクセル数の占める割合が全ピクセル数の90%以上である場合、切片像の画像情報の取得を終了するので、切片像の画像情報にノイズ成分が多く含まれ、切片像間のピクセル値の差が零にならない場合でも、確実に切片像の取得を終了し、意味のない画像情報を取得してしまうことがない。

【0053】図3はコンピュータ20による切片画像の他の取得方法を説明するフローチャートである(第2実施形態)。なお、図3においてS11~S18は各ステップを示す。

【0054】まず、ユーザは光軸方向の移動間隔等の情報をキーボード(図示せず)から入力する。この情報は、メモリ20Aに記憶される。

【0055】操作者は、Z軸コントローラ8を駆動し、モニタ22で画像を見ながら試料13の上端部の画像に焦点を合わせ、1枚目の切片像としてZ方向(光軸方向)の位置を設定する。この焦点位置で2次元スキャンユニット4による2次元走査を行い、切片像の画像情報をメモリ20Aに記憶する。(S11)。

【0056】次に、コンピュータ20はZ軸コントローラ8を駆動し、対物レンズ7を光軸方向へ所定間隔だけ下降させる(S12)。

【0057】この新たな焦点位置で、2次元スキャンユニット4による試料13の2次元走査を行い、切片像の画像情報を取得する(S13)。

【0058】コンピュータ20は、画像処理回路21から取得した画像情報から、各画素のピクセル値を求め、ピクセル値が20以上になるピクセル数の占める割合が全ピクセル数の10%以下であるか否かを判定する(S14)。

【0059】S14でピクセル値が20以上になるピクセル数の占める割合が全ピクセル数の10%以下でないと判断された場合には、今回取得した切片像の画像情報をメモリ20Aに記憶する(S15)。

【0060】S14でピクセル値が20以上になるピクセル数の占める割合が全ピクセル数の10%以下であると判断された場合には、今回取得した切片像の画像情報と前回取得した切片像の画像情報との除算(対応するピクセルのピクセル値の除算)を行う(S16)。

【0061】次に、コンピュータ20は、S16の除算結果が 1 ± 0.2 になるピクセル数を求め、そのピクセル数の占める割合が全ピクセル数の90%以上であるか否かを判定する(S17)。

【0062】除算結果が 1 ± 0.2 になるピクセル数の占める割合が全ピクセル数の90%以上でない場合には、取得した切片像の画像情報をメモリ20Aに記憶する(S18)。

【0063】除算結果が 1 ± 0.2 になるピクセル数の

占める割合が全ピクセル数の90%以上である場合には、試料13がないと判断して切片像の画像情報の取得を終了する(S19)。

【0064】この第2実施形態によれば、第1実施形態と同様の効果を発揮することができる。

【0065】なお、上記各実施形態では対物レンズを用いたが、DCモータではなくピエゾ素子、ステッピングモータ及び超音波モータ等を用いることもできる。

【0066】

【発明の効果】以上に説明したように請求項1に記載の発明のレーザ走査顕微鏡によれば、試料が存在し、前に取得した切片像と後で取得した切片像の画像情報が異なっている間は、焦点面の移動と切片像の取得とを行い、試料が存在しなくなり、前に取得した切片像と後で取得した切片像の画像情報が同じになったとき、光軸方向の移動と切片像の取得を終了させるので、試料の厚さを予め計算しなくとも過不足なく切片像の画像情報を取得することができる。

【0067】また、蛍光を発する試料の場合でも、試料の走査は1回でよいので、試料のダメージや蛍光の退色を抑えることができる。

【0068】請求項2に記載の発明のレーザ走査顕微鏡によれば、比較する前の輝度情報が予め定められた閾値以上の値を所定の割合以上有するときには、試料が存在すると判断され、切片像取得が続けられるので、切片像間のピクセル値の差が小さい場合でも切片像の取得を終了し、画像情報が不足してしまうという不都合が生じない。

【0069】請求項3に記載の発明のレーザ走査顕微鏡によれば、比較結果が予め定められた閾値以下の値を所定割合以上有するとき、試料が存在しないと判断され、切片像の取得を終了させるので、切片像の画像情報にノイズ成分が多く含まれ、切片像間のピクセル値の差が零にならない場合でも、確実に切片像の取得を終了し、意味のない画像情報を取得してしまう不都合が生じない。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はこの発明の第1実施形態に係る共焦点レーザ走査顕微鏡のブロック構成図である。

【図2】図2はコンピュータによる切片画像の取得方法を説明するフローチャートである。

【図3】図3はコンピュータによる切片画像の他の取得方法を説明するフローチャートである。

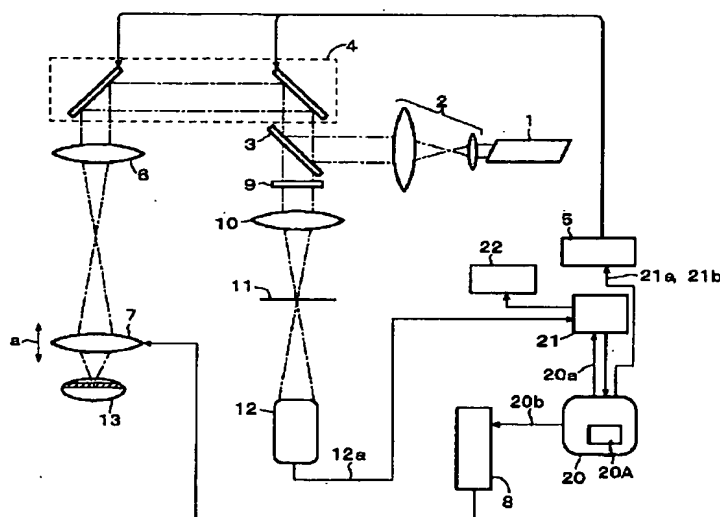
【図4】図4は試料の厚さと切片像の枚数との関係を説明する図である。

【図5】図5は試料の厚さと切片像の枚数との関係を説明する図である。

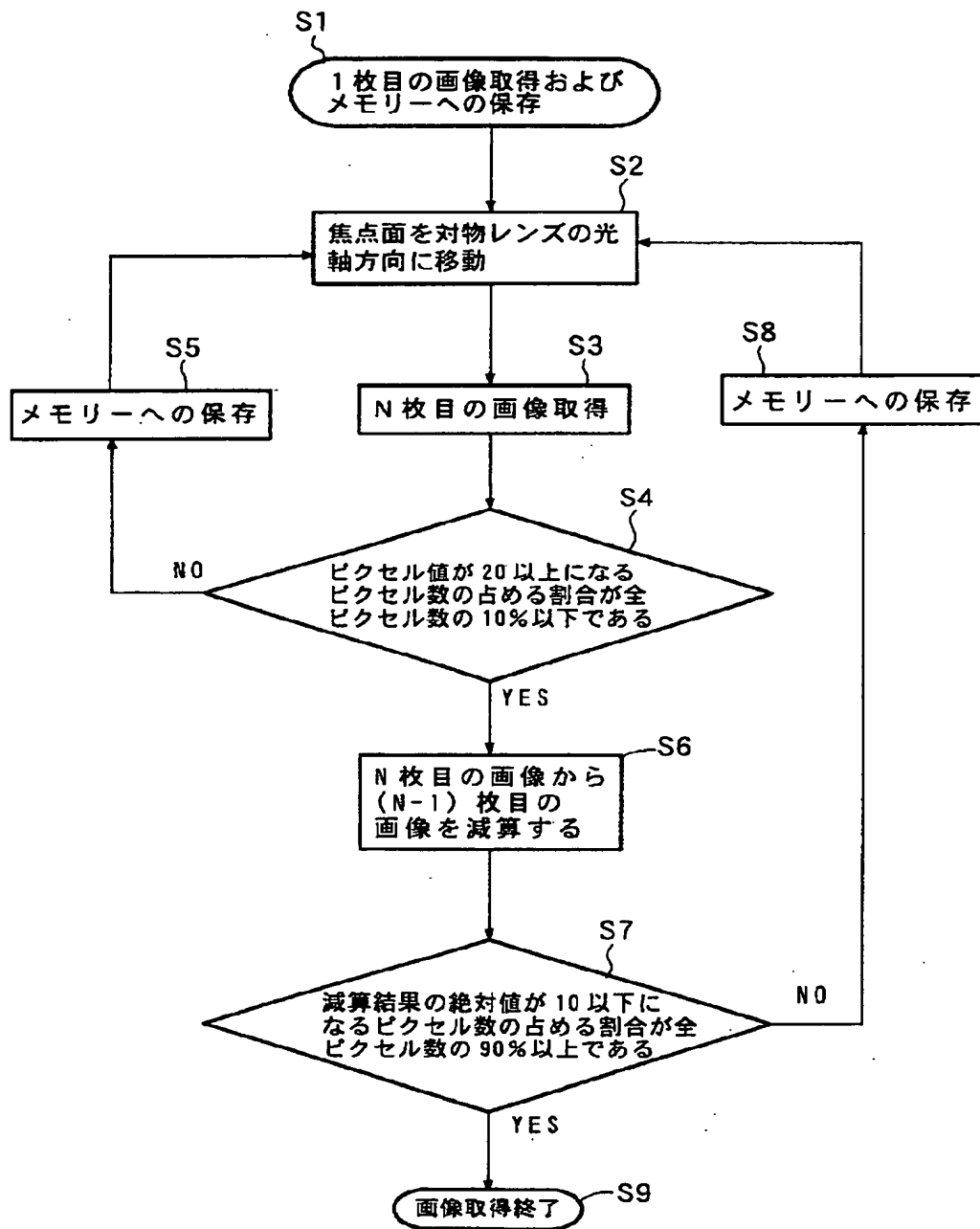
【符号の説明】

- 1 レーザ光源
- 2 ビームエキスパンダ
- 3 ダイクロイックミラー（光分離手段）
- 4 2次元スキャンユニット（走査手段）
- 7 対物レンズ
- 8 Z軸コントローラ（駆動手段）
- 11 ピンホールフィルタ
- 20 コンピュータ（制御手段）
- 22 モニタ（観察手段）

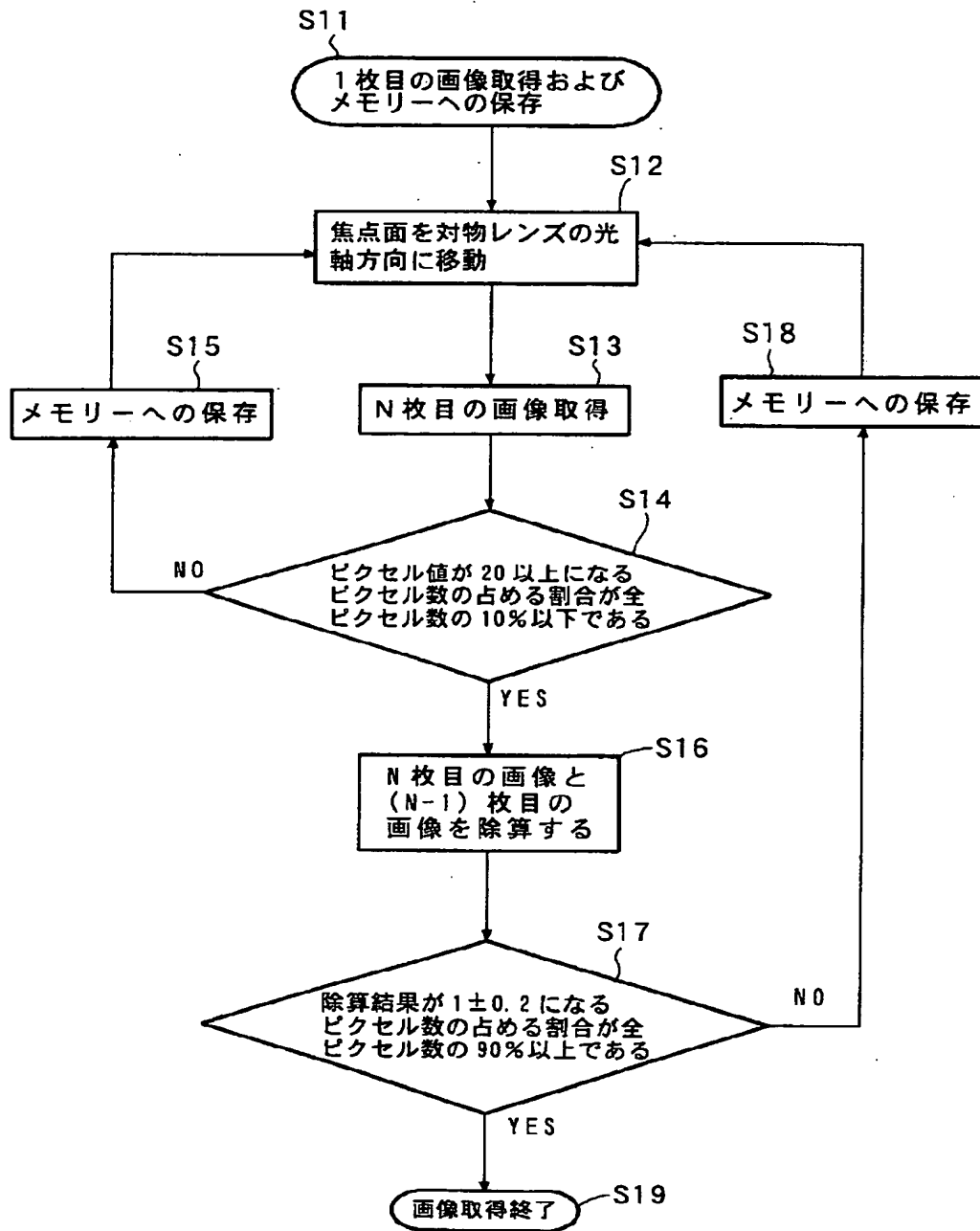
【図1】



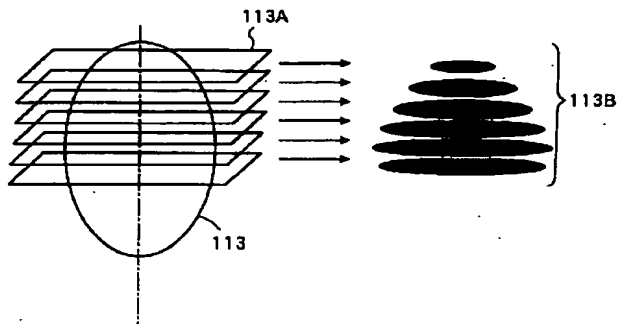
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

